



FR 04/02057

REC'D 05 NOV 2004
WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

### COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

10 AOUT 2004

Fait à Paris, le \_\_\_\_\_

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

### DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

REMISE DES PIÈCES

DATE

LIEU 31 JUIL 2003

75 INPI PARIS

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE

PAR L'INPI

0309440

31 juillet 03

Vos références pour ce dossier

(facultatif)

240736 D21384 NT

# BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

INPI  
N° 11354°03

### REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

page 1/2

BR1

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 © W / 030103

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE  
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

Cabinet REGIMBEAU  
20, rue de Chazelles  
75847 PARIS CEDEX 17  
FRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie

#### 2 NATURE DE LA DEMANDE

Demande de brevet

Demande de certificat d'utilité

Demande divisionnaire

Demande de brevet initiale

ou demande de certificat d'utilité initiale

Transformation d'une demande de  
brevet européen Demande de brevet initiale

N° attribué par l'INPI à la télécopie

Cochez l'une des 4 cases suivantes

Date

Date

Date

#### 3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

UTILISATION D'ANTICORPS OPTIMISES EN ADCC POUR TRAITER LES PATIENTS FAIBLES REPONDEURS

#### 4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date  N°

Pays ou organisation

Date  N°

Pays ou organisation

Date  N°

S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

#### 5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)

Personne morale  Personne physique

Nom  
ou dénomination sociale

LABORATOIRE FRANCAIS DU FRACTIONNEMENT ET DES  
BIOTECHNOLOGIES

Prénoms

GROUPEMENT D'INTERET PUBLIC

Forme juridique

180036147

N° SIREN

Code APE-NAF

Zone d'activité de Courtabœuf - 3, avenue des Tropiques  
91940 LES ULIS

Domicile

Rue

ou

FRANCE

siège

Pays

Française

Nationalité

N° de télécopie (facultatif)

N° de téléphone (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

**BREVET D'INVENTION  
CERTIFICAT D'UTILITÉ**

**REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2**

**BR2**

REMISE DES PIÈCES		Réservé à l'INPI
DATE	31 JUIL 2003	
LIEU	75 INPI PARIS	
N° D'ENREGISTREMENT	0309440	
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		

DB 540 W / 030103

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>		240736 NT
Nom		
Prénom		
Cabinet ou Société		Cabinet REGIMBEAU
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel		
Adresse	Rue	20, rue de Chazelles
	Code postal et ville	75847 PARIS CEDEX 17
	Pays	
N° de téléphone (facultatif)		01 44 29 35 00
N° de télécopie (facultatif)		01 44 29 35 99
Adresse électronique (facultatif)		info@regimbeau.fr
<b>7 INVENTEUR (S)</b>		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)
Établissement immédiat ou établissement différé		<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt
		<input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		<b>Uniquement pour les personnes physiques</b> <input type="checkbox"/> Requise pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenu antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences
Le support électronique de données est joint		<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>		 L. MARIELLO
		VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI

5 La présente invention concerne l'utilisation des anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains qui sont produits dans des lignées cellulaires sélectionnées, lesdits anticorps présentant une forte activité ADCC et induisant la sécrétion de cytokines et d'interleukines, pour traiter les sous populations de patients présentant un des polymorphismes du CD16.

10

L'immunothérapie au moyen d'anticorps monoclonaux est en passe de devenir un des aspects les plus importants de la médecine. En revanche, les résultats obtenus lors d'essais cliniques apparaissent contrastés. En effet, il peut s'avérer que l'anticorps monoclonal ne soit pas suffisamment efficace. De nombreux essais cliniques sont 15 arrêtés pour diverses causes telles que le manque d'efficacité et des effets secondaires incompatibles avec une utilisation en thérapie clinique. Ces deux aspects sont étroitement liés sachant que des anticorps peu actifs sont administrés à forte dose pour compenser et obtenir une réponse thérapeutique. L'administration de forte dose induit non seulement des effets secondaires mais est économiquement peu viable.

20

Ces problèmes sont majeurs dans l'industrie des anticorps monoclonaux chimériques, humanisés ou humains.

Or, ce problème est exacerbé pour des populations particulières de patients pour 25 lesquels l'effet thérapeutique des anticorps s'avère significativement plus faible comparé à la moyenne de la population.

Des études ont été menées afin de définir les sous-populations de patients réfractaires à la thérapie avec un anticorps donné. Par exemple, dans une étude, la population de 30 patients traités avec Rituxan® est composée de 20% de FCGR3A-158V homozygotes, 35% de FCGR3A-158F homozygotes et de 45% d'hétérozygotes (Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H, Therapeutic activity of

humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc $\gamma$ RIIIa gene, Blood. 2002 Feb 1;99(3):754-8). L'activité ADCC ainsi que l'efficacité clinique de l'anticorps anti-CD20 Rituxan® est différente suivant le polymorphisme du CD16, les patients F/F étant moins bons répondeurs que les patients 5 V/V.

Au contraire, des études cliniques réalisées avec des anticorps anti-Rhésus ont montré que l'élimination des hématies Rhésus positif par une IgG3 anti-D était plus rapide chez les patients F/F (Kumpel BM, De Haas M, Koene HR, Van De Winkel JG, 10 Goodrick MJ. Clearance of red cells by monoclonal IgG3 anti-D in vivo is affected by the VF polymorphism of Fc $\gamma$  IIIa (CD16). Clin Exp Immunol. 2003 Apr;132(1):81-6).

La cytotoxicité cellulaire médiée par les anticorps nécessite une fixation de la partie 15 Fab des anticorps sur leur cible ainsi qu'un engagement de leur partie Fc sur les récepteurs Fc des cellules effectrices (R Fc). Sur les cellules NK, le récepteur responsable de cette activité cytotoxique est le CD16 ou Fc gamma III.

Dans le cadre de l'invention, nous montrons que l'activité biologique des anticorps 20 produits dans CHO est affectée par le polymorphisme du CD16, ce qui n'est pas le cas pour nos anticorps optimisés présentant une activité ADCC améliorée. En outre, nous avons découvert que l'avantage de présenter une forte affinité pour le CD16 peut encore être renforcé par des tests supplémentaires visant à choisir les anticorps qui 25 induisent la production de cytokines. Les deux caractéristiques précitées se complémentent. En effet, la production de cytokine induite par les anticorps sélectionnés de l'invention pourrait renforcer activité cytotoxique des anticorps. Le mécanisme d'action d'une telle activation tient probablement à une régulation positive autocrine des cellules effectrices. On peut postuler que les anticorps qui se lient au CD16 provoquent une activité cytotoxique mais également induisent la production

d'IFN gamma qui au final peut conduire à augmenter encore davantage l'activité cytotoxique.

Ainsi, pour une sous population de patients, et cela en rapport avec le polymorphisme du CD16 ou un autre polymorphisme associé, l'efficacité du traitement est meilleure avec les anticorps optimisés de l'invention. L'affinité du récepteur pour le Fc des anticorps est différente suivant les polymorphismes du CD16, le phénotype V/V 158 ayant une meilleure affinité que la forme F/F 158. Nous montrons également que l'activité fonctionnelle des anticorps polyclonaux est beaucoup moins affectée par le polymorphisme du CD16 que celle des anticorps monoclonaux. Ainsi, les polyclonaux peuvent être utilisés comme témoins positifs lors de tests d'efficacité d'anticorps de différente origine dans le but de produire des anticorps destinés au traitement de sous populations de patients faiblement répondeurs.

15 L'invention propose donc d'utiliser pour le traitement de sous groupes de patients faiblement répondeurs, les anticorps décrits ci-après qui présentent une activité jusqu'à 100 fois supérieure aux anticorps disponibles en thérapie.

#### **Description**

20 Ainsi, l'invention se rapporte à l'utilisation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain optimisé caractérisé en ce que :

- a) il est produit dans une lignée cellulaire sélectionnée pour ses propriétés de glycosylation du fragment Fc d'un anticorps, ou
- 25 b) la structure glycannique du Fcgamma a été modifiée ex vivo, et/ou
- c) sa séquence primaire a été modifiée de façon à augmenter sa réactivité vis à vis des récepteurs Fc ;

ledit anticorps présentant i) un taux ADCC de type FcγRIII (CD16) supérieur à 60 %, 70%, 80 % ou de préférence supérieur à 90 % comparé au même anticorps produit 30 dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce, pour

la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies chez des patients présentant un des polymorphismes du récepteur CD16 et qualifiés de "faibles répondeurs" aux thérapies avec les anticorps actuellement disponibles. Par exemple dans le cas d'une étude de clairance des hématies ou d'un autre type cellulaire dans la circulation, on entend par patients "faibles répondeurs", les patients qui présentent une clairance significativement plus longue, vis à vis d'un autre groupe de patients. Dans le traitement des leucémies (lymphomes non Hodgkiniens), on distingue :

5 \* les fort répondeurs avec une réponse complète correspondant à la disparition de tous les symptômes et des signes mesurables de la maladie, tant du point de vue de l'examen clinique que des données biologiques de laboratoires et des études radiographiques. La diminution de la tailles des plus grandes tumeurs est supérieure à 75%).

10 \* les patients qui répondent partiellement sont décrits dans l'article Cheson BD et al, Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working Group. J Clin Oncol. 1999 Apr;17(4):1244. Review. Erratum in: J Clin Oncol 2000 Jun;18(11):2351.

15 \* Les faibles répondeurs, correspondent à des patients ayant un état dit stable, avec moins de 50% de réduction et moins de 25% d'augmentation des lésions. Pas de nouvelles lésions. Ce groupe de patients comprend également les patients pour lesquels aucune réponse n'est observée (progression de la maladie et mort).

20

25 L'invention s'adresse donc à une population particulière de patients présentant un polymorphisme du CD16 (V/V158 ; V/F158 ; F/F158), notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles et/ou subissant des effets secondaires indésirables justifiant l'administration de l'anticorps optimisé de l'invention.

30 Outre l'amélioration très significative de l'activité ADCC de type Fc $\gamma$ RIII (CD16), l'anticorps de l'invention peut être défini en ce qu'il présente ii) un taux de production d'au moins une cytokine par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant

le récepteur CD16 supérieur à 50 %, 100 % ou de préférence supérieur à 200 % comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou comparé à un anticorps homologue disponible dans le commerce.

5 De préférence, cet anticorps présente un taux ADCC supérieure à 100 % à une concentration de 10 ng/ml comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce et un taux de production d'au moins une cytokine par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur jusqu'à 1000 % à une concentration de 10 ng/ml comparé 10 au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce.

Lesdites cytokines libérées sont des interleukines, des interférons et des facteurs de nécrose tissulaire (TNF).

15 Ainsi, l'anticorps est sélectionné pour sa capacité d'induire la sécrétion d'au moins une cytokine choisie parmi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, TNFa, TGF $\beta$ , IP10 et IFN $\gamma$  par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16.

20 De préférence, l'anticorps sélectionné a la capacité d'induire la sécrétion d' IFN $\gamma$  par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16. Le taux d' IFN $\gamma$  sécrété reflète la qualité de l'anticorps fixé par le récepteur CD16 quant à son intégrité (fonction Fc) et à sa capacité (site antigénique) de liaison à l'antigène. En 25 outre, la sécrétion d'IFN $\gamma$  contribue à renforcer l'active l'activité cytotoxique des cellules effectrices.

Les cellules effectrices peuvent exprimer un CD16 endogène ou être transformées. On entend par cellule transformée, une cellule modifiée génétiquement de sorte à exprimer 30 un récepteur, en particulier le récepteur CD16.

Dans un mode de réalisation particulier, l'anticorps de l'invention est capable d'induire la sécrétion d'au moins une cytokine par une cellule leucocytaire, en particulier de la famille des NK (natural killer) ou par des cellules du groupe monocytes-macrophages.

- 5 De préférence, on utilise pour la sélection des anticorps une lignée Jurkat transfectée avec un vecteur d'expression codant pour le récepteur CD16 comme cellule effectrice. Cette lignée est particulièrement avantageuse car elle est immortalisée c'est à dire qu'elle se développe indéfiniment dans des milieux cultures et qu'elle permet d'obtenir des résultats reproductibles de par sa stabilité d'expression du CD16.
- 10 Différentes lignées Jurkat transfectées avec un vecteur d'expression codant pour le récepteur CD16 peuvent être utilisées comme cellule effectrice, lesdites lignées exprimant chacune un CD16 particulier (V/V158 ; V/F158 ou F/F158).

En outre, l'anticorps peut être sélectionné après avoir été purifié et/ou modifié ex vivo 15 par modification de la structure glycannique du fragment Fc.

La sélection peut se faire sur des anticorps produits par des cellules couramment utilisées pour la production d'anticorps thérapeutiques, telles que les lignées de myélomes de rat, en particulier YB2/0 et ses dérivés, les cellules lymphoblastoïdes 20 humaines, les cellules d'insectes et les cellules de myélomes murines. La sélection peut également être appliquée à l'évaluation d'anticorps produits par des plantes transgéniques ou de mammifères transgéniques. A cet effet, la production dans CHO sert de référence (CHO étant employée pour la production d'anticorps médicament) pour comparer et sélectionner les systèmes de production conduisant aux anticorps 25 selon l'invention. Une comparaison avec des anticorps polyclonaux peut également être utile lors des tests d'efficacité des anticorps monoclonaux. Une autre alternative consiste à effectuer la comparaison avec les anticorps disponibles dans le commerce, en particulier les anticorps en cours de développement, les anticorps ayant obtenu une AMM ou encore des anticorps dont les essais cliniques ont été arrêtés et qui se sont 30 révélés peu efficaces et/ou produisant des effets secondaires indésirables aux doses

administrées. En effet, les anticorps modifiés de l'invention sont jusqu'à 100 fois plus efficaces pour activer l'ADCC des cellules effectrices du système immunitaires, ce qui implique des doses d'administration inférieures à celles pratiquées par les anticorps mentionnés précédemment et dans le cas présent la possibilité de traiter des patients pour lesquels les anticorps actuellement disponibles se sont révélés inefficaces.

5 Dans un aspect préféré de l'invention, l'anticorps peut dans un premier temps être sélectionné pour son affinité au récepteur CD16 puis testé et sélectionné tel que décrit ci-dessus pour ses propriétés à induire la production d'une cytokine, notamment l'IL-2, par les cellules Jurkat CD16 ou d'IFN $\gamma$  par les cellules effectrices exprimant le CD16.

10 De tels anticorps possédant cette double propriété d'induire l'ADCC via le CD16 et d'induire la production de l'IL-2 conduisent à une stimulation très importante de l'activité cytotoxique des cellules effectrices.

15 Ainsi, l'invention vise l'utilisation de l'anticorps défini ci-dessus pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une population particulière de patients présentant un polymorphisme du CD16 (V/V158 ; V/F158 ; F/F158), notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

20 L'anticorps de l'invention peut être produit dans des lignées cellulaires du type myélome de rat, par exemple YB 2/0 (ATCC n° CRL 1662). Ainsi, dans un aspect complémentaire, l'invention porte sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain produit dans une lignée de myélome de rat, par exemple YB2/0, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de patients présentant un polymorphisme du CD16 (notamment V/F158 ou F/F158), en particulier des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables justifiant l'administration 25 de l'anticorps optimisé de l'invention. De préférence, l'invention porte sur l'utilisation 30 de l'anticorps optimisé de l'invention. De préférence, l'invention porte sur l'utilisation

d'anticorps produits dans des lignées de myélomes de rat, notamment YB2/0 et ses dérivés, lesdits anticorps possédant la double propriété d'induire l'ADCC via le CD16 et d'induire la production de l'IL-2 conduisant à une forte activation de l'activité cytotoxique des cellules effectrices CD16 de polymorphisme V/F158 ou F/F158 pour 5 la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une population particulière de patients faibles répondeurs ou se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

10 Dans un autre aspect supplémentaire, l'invention concerne l'utilisation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain dont la structure glycannique du Fc de l'anticorps correspond à un type biantenné, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de patients présentant un polymorphisme du CD16 (V/V158 ; V/F158 ; F/F158), 15 notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables justifiant l'administration de l'anticorps optimisé de l'invention. Dans ces anticorps, le taux de GlcNac intermédiaire est non nul. Par exemple, on peut utiliser les compositions présentant une teneur supérieure à 60%, de préférence supérieure à 80% pour les 20 formes G0 + G1 + G0F + G1F étant entendu que les formes G0F + G1F sont inférieures à 50%, de préférence inférieures à 30%.

25 L'anticorps de l'invention peut être dirigé contre un antigène normal non ubiquitaire (exemple, l'anticorps est de spécificité anti- Rhésus du globule rouge humain), ou un antigène d'une cellule pathologique ou d'un organisme pathogène pour l'homme, en particulier contre un antigène d'une cellule cancéreuse. Il est avantageux d'utiliser les anticorps définis ci-dessus pour le traitement des cancers et des infections par des agents pathogènes pour ces patients.

Parmi les pathologies nécessitant l'administration de tels anticorps chez ces patients, on peut citer à titre d'exemple les maladies échappant à la réponse immune notamment choisie parmi la maladie hémolytique du nouveau né, le Syndrome de Sezary, les leucémies myéloïdes chroniques, les cancers solides, notamment dont les cibles 5 antigéniques sont faiblement exprimées, notamment le cancer du sein, les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphenyles polychlorinés, les maladies infectieuses, notamment la tuberculose, le syndrome de la fatigue chronique (CFS), les infections parasitaires comme par exemple les schistosomules, et les infections virales pour cibler les cellules réservoirs.

10

Parmi les cancers, on vise plus particulièrement les cancers des cellules HLA classe II positives, les lymphomes de cellules B, les leucémies aiguës de cellules B, le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les leucémies myéloïdes, les lymphomes et leucémies de cellules T, les lymphomes non hodgkinien et les leucémies 15 myéloïdes chroniques. A ce titre, l'anticorps peut être un anti-HLA-DR ou un anti-CD20.

Ainsi, à titre d'exemple, les anticorps selon l'invention peuvent être des anticorps de seconde génération correspondant aux anticorps disponibles actuellement listés dans le

Tableau 1.

20

Tableau 1

Nom et marque commerciale de l'anticorps	Société	cible	indication
Edrecolomab PANOREX	Centocor	anti Ep-CAM	colorectal cancer
Rituximab RITUXAN	Idec Licensing à Genentech/ Hoffman la roche	anti CD20	B cell lymphoma thrombocytopenia purpura
Trastuzumab HERCEPTIN	Genentech Licensing à Hoffman la roche/Immunogen	anti HER2	ovarian cancer

Palivizumab <i>SYNAGIS</i>	Medimmune Lensié à Abott		RSV
Alemtuzumab <i>CAMPATH</i>	BTG Lensié à Schering	anti CD52	leukemia
ibritumomab tuxetan <i>ZEVALIN</i>	IDEA Lensié à Schering	anti CD20	NHL
Cetuximab <i>IMC-C225</i>	Merck /BMS / Imclone	anti HER1	cancers
Bevacizumab <i>AVASTIN</i>	Genentech/ Hoffman la roche	anti VEGF	cancers
Epratuzumab	Immumedics/ Amgen	anti CD22	cancers: non hogkin lymphoma cancers
Hu M195Mab	Protein Design Labs	ND	
MDX-210	Immuno-Designed Molécules	ND	cancers
BEC2 Mitumomab	Imclone	anti GD3	cancers
Oregovomab <i>OVAREX</i>	Altarex	anti CA125	Ovarian cancer
Ecromeximab <i>KW-2971</i>	Kyowa-Hakko	anti GD	malignant melanoma
ABX-EGF	Abgenix	EGF	cancers
MDX010	Medarex	ND	Cancers
XTL 002	XTL biopharmaceuticals	ND	anti-viral : HCV
H11 SCFV	viventia biotech	ND	cancers
4B5	viventia biotech	anti GD2	Cancers

XTL 001	XTL biopharmaceuticals	ND	anti-viral : HBV
MDX-070	MEDAREX	Anti-PSMA	Prostate cancer
TNX-901	TANOX	anti CD-23	
IDEC-114	IDEC	inhibition ProteinC	non-Hodgkin lymphoma

D'autres anticorps peuvent être sélectionnés parmi les anti Ep-CAM, anti HER2, anti CD52, anti HER1, anti GD3, anti CA125, anti GD, anti GD2, anti CD-23 et anti ProteinC ; anti-KIR3DL2, anti-CD38, anti-CD30, anti-CD33, anti-CD44, des anti-5 idiotypes spécifiques d'inhibiteurs par exemple de facteurs de coagulation, les anti-viraux : HIV, HBV, HCV et RSV.

Dans un aspect préféré, l'anticorps est un anti-HLA-DR. Cet anticorps présente un taux ADCC supérieure à 100 % à une concentration de 10 ng/ml et un taux de 10 production d'IL2 par la cellule Jurkat CD16, ou d'IFN $\gamma$  par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur jusqu'à 1000 % à une concentration de 10 ng/ml comparé au même anticorps exprimé dans la lignée CHO, lignée d'expression du Remitogen®.

L'anti-HLA-DR de l'invention peut être produit dans une lignée de myélome de rat, 15 notamment YB2/0.

Dans un autre aspect préféré, l'anticorps de l'invention est un anti-CD20. Cet anticorps présente un taux ADCC supérieure à 100 % à une concentration de 10 ng/ml et un taux de 20 production d'IL-2 par la cellule Jurkat CD16 supérieur jusqu'à 1000 % à une concentration de 10 ng/ml comparé au Rituxan®.

L'anti-CD20 de l'invention peut être produit dans une lignée de myélome de rat, notamment YB2/0.

L'invention porte également sur l'utilisation d'un anticorps décrit ci-dessus pour la fabrication d'un médicament destiné à induire l'expression de TNF, IFN $\gamma$ , IP10 et IL-6 par les cellules effectrices naturelles du système immunitaire, ledit médicament étant utile notamment pour le traitement du cancer et des infections chez les patients 5 présentant un des polymorphismes du CD16 (V/V158 ; V/F158 ; F/F158), notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables justifiant l'administration de l'anticorps optimisé de l'invention.

10 **Exemple 1 : Comparaison de l'efficacité entre l'anticorps monoclonal anti-Rhésus D R297 et d'un anticorps polyclonal anti-D dans une population de patients.**

Les capacités respectives de l'anticorps monoclonal anti-Rhésus D R297 et d'un anticorps polyclonal anti-D à lyser des hématies en présence de cellules effectrices de 15 différents donneurs individuels (N=107) sont comparées après 16h d'incubation. Parmi les 107 donneurs, nous avons retrouvé l'ensemble des différents phénotypes du CD16 (V/V158 ; V/F158 ; F/F158).

20 Les résultats montrent une grande variabilité dans la capacité des cellules effectrices des différents sujets à induire une lyse des hématies Rhésus positif. Les anticorps exprimés dans la lignée cellulaire YB2/0 présentent une activité cytolytique comparable à celle des anticorps polyclonaux, cela quel que soit le donneur étudié, et donc quel que soit le polymorphisme du CD16 des cellules effectrices des donneurs (voir figure 1).

25

Le typage V/F158 des différents sujets dont les cellules ont été utilisées pour réaliser des tests d'ADCC avec les anti-D a montré que l'anticorps produit dans CHO réagit beaucoup moins bien avec l'un des polymorphismes du CD16 par rapport à l'anticorps produit dans YB2/0 ou à l'anticorps polyclonal.

30

**Exemple 2 : Comparaison de l'efficacité des anticorps produits dans CHO et YB2/0 en fonction du polymorphisme du CD16 .**

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène Rhésus D a été  
5 transfectée dans les lignées cellulaires CHO et YB2/0. Les anticorps ont été incubés avec des hématies Rhésus positif (cellules cibles) et des cellules mononucléées humaines provenant de 30 donneurs différents (cellules effectrices). L'activité cytotoxique des anticorps sur les hématies (ADCC) a été évaluée après 16h d'incubation et comparée à celle d'un anticorps polyclonal anti-D de référence.

10 Conclusion : L'anticorps produit dans la lignée CHO a toujours été à l'origine de l'induction d'une lyse faible, et ceci plus particulièrement avec les cellules effectrices des sujets exprimant un des phénotypes du CD16. Par contre, l'anticorps R297 exprimé dans la lignée YB2/0 a toujours été capable d'induire une forte activité 15 cytolytique et les pourcentages d'ADCC obtenus ont été comparables à ceux induits par l'anticorps polyclonal de référence.

L'anticorps exprimé dans la lignée YB2/0 s'avère donc être un bien meilleur produit pour traiter les patients donnant une lyse faible avec les anticorps produits dans CHO.

20 **Exemple 3 : Comparaison T125 CHO et T125 YB2/0 sur Jurkat CD16 F/F et Jurkat CD16 V/V.**

La même séquence codant pour une IgG1 spécifique de l'antigène Rhésus D a été  
25 transfectée dans les lignées cellulaires CHO et YB2/0. Les anticorps ont été incubés avec des hématies Rhésus positif (cellule cible) et des cellules Jurkat CD16 (cellules effectrices). Deux types de cellules Jurkat ont été utilisées : 1- des cellules transfectées avec le gène codant pour un R Fc portant l'acide aminé phénylalanine F en position 158 (forme F/F), 2- des cellules transfectées avec le gène codant pour un R Fc portant

l'acide aminé valine V en position 158 (forme V/V). La quantité de cytokines (IL2) sécrétée par les cellules Jurkat CD16 a été mesurée par ELISA.

Résultats :

5 L'anticorps exprimé dans la lignée YB2/0 est capable d'induire une forte activité cytolytique des hématies Rhésus positif alors que l'anticorps produit dans la lignée CHO réagit moins bien avec l'une des deux formes. D'autre part, l'anticorps exprimé dans YB2/0 présente une activité cytotoxique comparable à celle obtenue avec un anticorps polyclonal de référence.

10

En présence d'immunoglobuline polyvalentes, donc dans des conditions plus physiologiques, seul l'anticorps exprimé dans YB2/0 réagit comme l'anticorps Polyclonal.

15

L'anticorps exprimé dans la lignée YB2/0 s'avère donc être un bien meilleur produit pour traiter les patients donnant une lyse faible avec les anticorps produits dans CHO.

**REVENDICATIONS**

5    1. Utilisation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain optimisé caractérisé en ce que :

- a) il est produit dans une lignée cellulaire sélectionnée pour ses propriétés de glycosylation du fragment Fc d'un anticorps, ou
- b) la structure glycannique du Fcgamma a été modifiée ex vivo, et/ou
- 10    c) sa séquence primaire a été modifiée de façon à augmenter sa réactivité vis à vis des récepteurs Fc ;

15    ledit anticorps présentant i) un taux ADCC de type FcγRIII (CD16) supérieur à 60 %, 70 %, 80 % ou de préférence supérieur à 90 % comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies chez des patients présentant un des polymorphismes du récepteur CD16.

20    2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que les patients sont choisis dans une sous population de patients qualifiés de "faibles répondeurs".

25    3. Utilisation selon la revendication 2 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies chez des patients présentant le polymorphisme du CD16 V/F158.

25    4. Utilisation selon la revendication 2 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies chez des patients présentant le polymorphisme du CD16 F/F158.

Rev. 1a-10

## JEU PRINCIPAL

## **REVENDICATIONS**

5 1. Utilisation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain dont la structure glycannique du Fc de l'anticorps correspond à un type biantenné, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de patients présentant un des polymorphismes du

10 CD16, en particulier V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

15 2. Utilisation d'une composition d'anticorps définis à la revendication 1, ladite composition présentant une teneur supérieure à 60%, de préférence supérieure à 80% pour les formes G0 + G1 + G0F + G1F étant entendu que les formes G0F + G1F sont inférieures à 50%, de préférence inférieures à 30%, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de patients présentant un des polymorphismes du CD16, en particulier V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

20 3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'anticorps est dirigé contre un antigène normal non ubiquitaire, notamment un anti- Rhésus du globule rouge humain, ou un antigène d'une cellule pathologique ou d'un organisme pathogène pour l'homme, en particulier contre un antigène d'une cellule cancéreuse.

25 4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers et des infections par des agents pathogènes.

REVENDICATIONS

- 5 1. Utilisation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain dont la structure glycannique du Fc de l'anticorps correspond à un type biantenné, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannoses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de patients présentant un des polymorphismes du  
10 CD16, en particulier V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.
- 15 2. Utilisation d'une composition d'anticorps définis à la revendication 1, ladite composition présentant une teneur supérieure à 60%, de préférence supérieure à 80% pour les formes G0 + G1 + G0F + G1F étant entendu que les formes G0F + G1F sont inférieures à 50%, de préférence inférieures à 30%, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de patients présentant un des polymorphismes du  
20 CD16, en particulier V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.
- 25 3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que l'anticorps est dirigé contre un antigène normal non ubiquitaire, notamment un anti- Rhésus du globule rouge humain, ou un antigène d'une cellule pathologique ou d'un organisme pathogène pour l'homme, en particulier contre un antigène d'une cellule cancéreuse.
4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers et des infections par des agents pathogènes.

5. Utilisation selon la revendication 2 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies chez des patients présentant le polymorphisme du CD16 V/V158.

5 6. Utilisation selon la revendication 2 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de pathologies chez des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles et/ou subissant des effets secondaires indésirables.

10 7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que ledit anticorps optimisé présente ii) une capacité à induire un taux de production d'au moins une cytokine par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur à 50 %, 100 % ou de préférence supérieur à 200 % comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou comparé à un anticorps homologue disponible dans le commerce.

15 . . .

20 8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que ledit anticorps optimisé présente un taux ADCC supérieure à 100 % à une concentration de 10 ng/ml comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce et une capacité à induire un taux de production d'au moins une cytokine par une cellule effectrice du système immunitaire exprimant le récepteur CD16 supérieur à 1000 % à une concentration de 10 ng/ml comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce.

25 9. Utilisation selon l'une des revendications 7 et 8, caractérisée en ce que lesdites cytokines libérées sont des interleukines, des interférons et des facteurs de nécrose tissulaire (TNF).

30 10. Utilisation selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisée en ce que l'anticorps est sélectionné pour sa capacité d'induire la sécrétion d'au moins une cytokine choisie

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies échappant à la réponse immune notamment choisie parmi la maladie hémolytique du nouveau né, le Syndrome de Sezary, les leucémies myéloïdes chroniques, les cancers solides, notamment dont les cibles antigéniques sont 5 faiblement exprimées, notamment le cancer du sein, les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphenyles polychlorinés, les maladies infectieuses, notamment la tuberculose, le syndrome de la fatigue chronique (CFS), les infections parasitaires comme par exemple les schistosomules, et les infections virales.

10 6. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers des cellules HLA classe II positives, les lymphomes de cellules B, les leucémies aiguës de cellules B, le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les leucémies myéloïdes, les lymphomes et leucémies de 15 cellules T, les lymphomes non hodgkinien et les leucémies myéloïdes chroniques.

7. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que l'anticorps est un anti-HLA-DR ou un anti-CD20.

20 8. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 7, pour la fabrication d'un médicament destiné à induire une cytotoxicité par ADCC de type Fc $\gamma$ RIII (CD16) améliorée, supérieure à 60% comparé au même anticorps produit dans CHO ou à un produit homologue disponible dans le commerce, ledit médicament étant utile notamment pour le traitement du cancer et des infections chez les patients présentant un des 25 polymorphismes du CD16 V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

9. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 8, pour la fabrication d'un médicament 30 destiné à induire une cytotoxicité par ADCC de type Fc $\gamma$ RIII (CD16) améliorée,

parmi IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, TNFa, TGF $\beta$ , IP10 et IFN $\gamma$  par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16.

11. Utilisation selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisée en ce que l'anticorps  
5 induit la sécrétion d'IFN $\gamma$  par les cellules effectrices du système immunitaire exprimant le récepteur CD16.

12. Utilisation selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisée en ce que l'anticorps induit la sécrétion d'au moins une cytokine par une cellule leucocytaire, en particulier  
10 de la famille des NK (natural killer) ou par des cellules du groupe monocytes-macrophages.

13. Utilisation selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisée en ce que l'anticorps est sélectionné en mettant en œuvre des lignées Jurkat transfectées avec un vecteur  
15 d'expression codant pour le récepteur CD16 comme cellule effectrice, lesdites lignées exprimant chacune un CD16 particulier (V/V158 ; V/F158 ou F/F158), et en option en utilisant des anticorps polyclonaux comme référence.

14. Utilisation selon l'une des revendications 7 à 13, caractérisée en ce que l'anticorps  
20 est sélectionné parmi des anticorps produits par des cellules couramment utilisées pour la production d'anticorps thérapeutiques, telles que les lignées de myélomes de rat, en particulier YB2/0 et ses dérivés, les cellules lymphoblastoïdes humaines, les cellules d'insectes et les cellules de myélomes murines, les plantes transgéniques ou les mammifères non humains transgéniques.

25

15. Utilisation d'anticorps produit dans des lignées de myélomes de rat, notamment YB2/0 et ses dérivés, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une population particulière de patients faibles répondeurs ou se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets  
30 secondaires indésirables

supérieure à 100% lorsque ledit anticorps est à une concentration de 10 ng/ml comparé au même anticorps produit dans une lignée CHO ou à un anticorps homologue disponible dans le commerce.

- 5 10. Utilisation selon l'une des revendication 1 à 9, pour la fabrication d'un médicament destiné à induire l'expression de TNF, IFN $\gamma$ , IP10 et IL-6 par les cellules effectrices naturelles du système immunitaire, ledit médicament étant utile notamment pour le traitement du cancer et des infections chez les patients présentant un des polymorphismes du CD16 V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en 10 échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

16. Utilisation d'anticorps produit dans des lignées de myélomes de rat, notamment YB2/0 et ses dérivés, lesdits anticorps possédant la double propriété d'induire l'ADCC via le CD16 et d'induire la production de l'IFN $\gamma$  conduisant à une forte activation de l'activité cytotoxique des cellules effectrices CD16 de polymorphisme V/F158 ou F/F158 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement d'une population particulière de patients faibles répondeurs ou se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

5

10 17. Utilisation d'un anticorps monoclonal chimérique, humanisé ou humain dont la structure glycannique du Fc de l'anticorps correspond à un type biantenné, avec des chaînes courtes, une faible sialylation, des mannooses et GlcNAc du point d'attache terminaux non intercalaires, et une faible fucosylation pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de patients présentant un des polymorphismes du

15 CD16, en particulier V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

20 18. Utilisation d'une composition d'anticorps définis à la revendication 15, 16 ou 17, ladite composition présentant une teneur supérieure à 60%, de préférence supérieure à 80% pour les formes G0 + G1 + G0F + G1F étant entendu que les formes G0F + G1F sont inférieures à 50%, de préférence inférieures à 30%, pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de patients présentant un des polymorphismes du CD16, en particulier V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

25

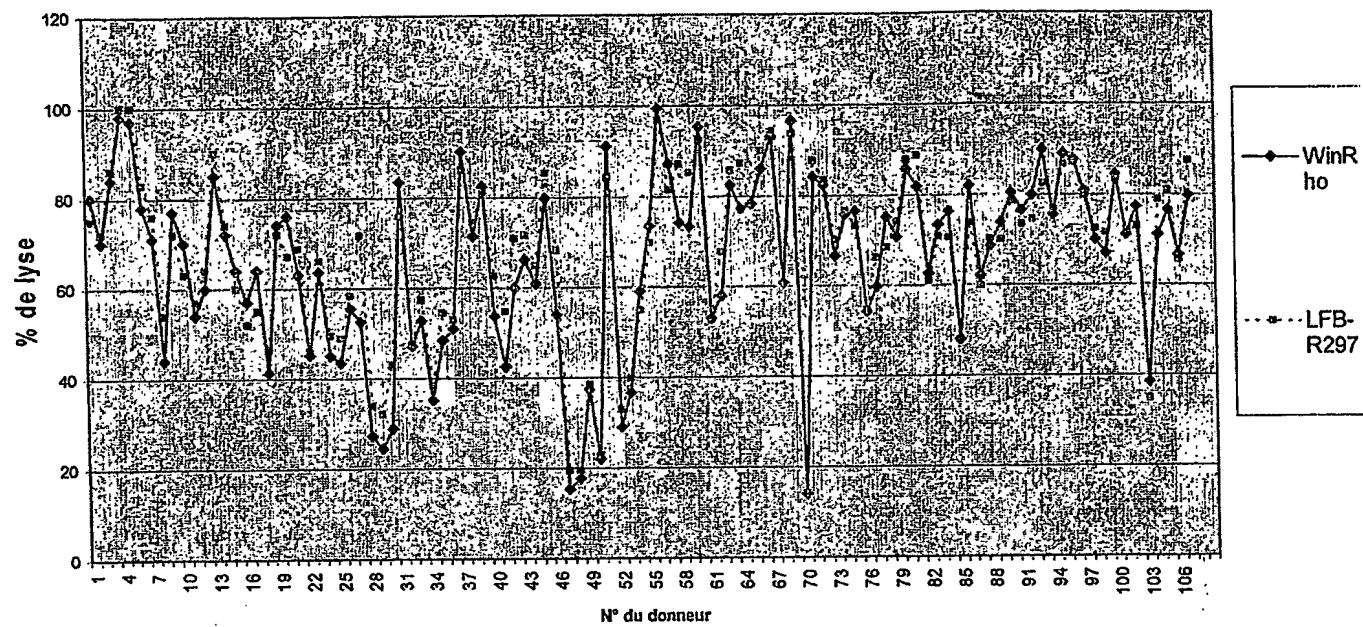
19. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 18, caractérisé en ce que l'anticorps est dirigé contre un antigène normal non ubiquitaire, notamment un anti- Rhésus du

globule rouge humain, ou un antigène d'une cellule pathologique ou d'un organisme pathogène pour l'homme, en particulier contre un antigène d'une cellule cancéreuse.

20. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 19 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers et des infections par des agents pathogènes.  
5
21. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 19 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des maladies échappant à la réponse immune 10 notamment choisie parmi la maladie hémolytique du nouveau né, le Syndrome de Sezary, les leucémies myéloïdes chroniques, les cancers solides, notamment dont les cibles antigéniques sont faiblement exprimées, notamment le cancer du sein, les pathologies liées à l'environnement visant notamment les personnes exposées aux biphenyles polychlorinés, les maladies infectieuses, notamment la tuberculose, le 15 syndrome de la fatigue chronique (CFS), les infections parasitaires comme par exemple les schistosomules, et les infections virales.
22. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 19 pour la préparation d'un médicament destiné au traitement des cancers des cellules HLA classe II positives, les 20 lymphomes de cellules B, les leucémies aiguës de cellules B, le lymphome de Burkitt, le lymphome de Hodgkin, les leucémies myéloïdes, les lymphomes et leucémies de cellules T, les lymphomes non hodgkinien et les leucémies myéloïdes chroniques.
23. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 19 caractérisée en ce que l'anticorps 25 est un anti-HLA-DR ou un anti-CD20.
24. Utilisation selon l'une des revendication 1 à 18 pour la fabrication d'un médicament destiné à induire l'expression de TNF, IFN $\gamma$ , IP10 et IL-6 par les cellules effectrices naturelles du système immunitaire, ledit médicament étant utile notamment 30 pour le traitement du cancer et des infections chez les patients présentant un des

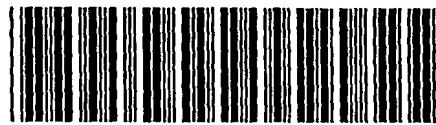
polymorphismes du CD16 V/F158 ou F/F158, notamment des patients se trouvant en échec thérapeutique avec les anticorps actuellement disponibles ou subissant des effets secondaires indésirables.

ADCC avec des cellules effectrices de différents donneurs de sang.  
Tégaline 100µg/puits



**FIGURE 1**

PCT/FR2004/002057



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.